

平成30年4月26日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14497

研究課題名(和文) Multi-step細胞融合による複合遺伝子回路の構築工法

研究課題名(英文) Construction method for complicated gene circuits by multi-step cell fusion

研究代表者

福田 展雄 (Fukuda, Nobuo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：00613548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：合成生物学では、電子回路の集積手法をヒントとして、遺伝子パーツにより構成される回路を組み上げて複合化することにより、高度な生命機能を創出することを目指している。本研究では、ある機能単位を有する酵母細胞を細胞融合(接合)させることにより、各酵母が有する遺伝子パーツを段階的に統合する技術基盤を確立することに成功した。本技術は学術研究に利用される一般的な実験室酵母に広く適用することが可能であるため、遺伝子バンク等に存在する豊富なリソースを大いに活用することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Synthetic biology aims to create advanced vital functions by combining circuits composed of genetic parts as well as integration methods of electronic circuits to form complexes. In this study, we succeeded in establishing a technology for stepwise integration of genetic parts by cell fusion (mating) of yeast cells having certain functional units. Since this technology can be widely applied to general laboratory yeasts used for academic research, it is possible to make full use of abundant resources existing in gene banks and the like.

研究分野：微生物工学

キーワード：酵母 接合 遺伝子パーツ

1. 研究開始当初の背景

合成生物学では、電子回路の集積手法をヒントとして、遺伝子パーツにより構成される回路を組み上げて複合化することにより、高度な生命機能を創出することを目指している。しかしながら情報工学に基づく合理的な遺伝子回路の設計は現時点では未だ不完全である。そのため構築した細胞の表現型を確認して不十分であれば、問題点を明確化したうえで設計に立ち戻り改良する必要がある。この試行錯誤のサイクルは非常に緩慢であり、とくに細胞の構築プロセスには多くの時間、費用および労力を要する。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、最も理解された生命システムの1つであり、数多くの有用化合物の生産に利用されてきた。有性生殖に基づく酵母株の創製・改良方法では、各親株から一部の遺伝情報が継承されることで、次世代には多様な特性を有する酵母細胞群が生み出される可能性がある。ところが、次世代の各細胞に注目すれば、親株から継承できずに失われる配列情報が必ず存在し、望みの表現型を有する酵母株を合理的に創製することは困難であった。一方、プロトプラスト融合を用いた多倍体の創製法では、一過的には両親株の遺伝情報を全て統合することが可能であるが、そのゲノム安定性には大きな問題がある。以上のように、とりわけ細胞の構築において、合成生物学が目指す合理的な生命機能を創出するための技術基盤の整備には改善の余地があった。

2. 研究の目的

本研究では、接合型遺伝子座特異的エンドヌクレアーゼ Ho を用いた多倍体酵母の創製法を確立することで、ある機能単位を有する酵母細胞を遺伝子パーツのベクターと見なし、それらを統合する技術を開発することを目的とした。細胞融合（接合）により、各酵母が有する遺伝子パーツを段階的に統合する技術基盤を確立することで、遺伝子回路構築の効率化、ならびに各段階における酵母の表現型の確認を容易化することが可能となる。そこで当該技術の有効性を検証・評価することを本課題における達成目標とした。

3. 研究の方法

酵母の接合型遺伝子には a 型と α 型が存在し、有性生殖の一環として a 型と α 型の酵母が融合して a/ α 型の酵母を形成する。酵母の細胞内で Ho を発現すると双方向の接合型変換が生じるが、S288C 株由来の実験室酵母は一塩基変異を有しており、a 型から α 型への変換が殆ど発生しない。すなわち、a/ α 型酵母に Ho を発現させれば、全ての接合遺伝子座が a 型となった酵母のみを得ることができ、これを α 型酵母と融合することで多倍体化が可能となる。さらに得られた酵母に Ho を発現させることで、再び a 型酵母を生み出すこ

とができる。すなわち図 1 に示すように、異なる遺伝子パーツを有する α 型酵母を細胞融合により統合することで、遺伝子回路を構築していくことが可能となる。

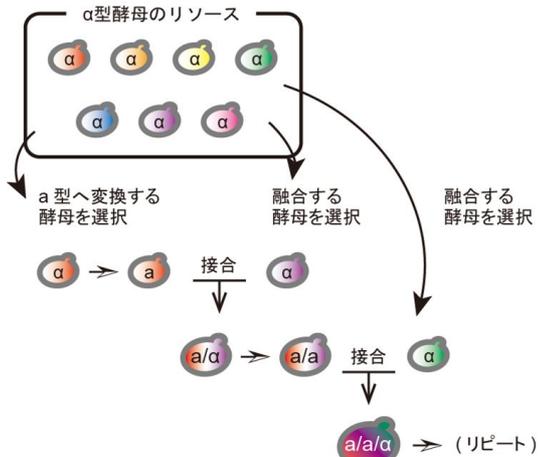


図 1 接合を用いた多倍体酵母創製の概要

本研究において、緑色ならびに赤色蛍光タンパク質、転写活性化因子を遺伝子パーツのモデルとして用い、これらを発現する α 型の一倍体酵母を創製した(図 2)。さらに α 型から a 型への接合型変換を行うため、HO 遺伝子の発現ベクターを構築した。当該発現ベクターを導入することで、創製した一倍体酵母を段階的に統合していき、各段階における酵母細胞の蛍光特性を評価した。

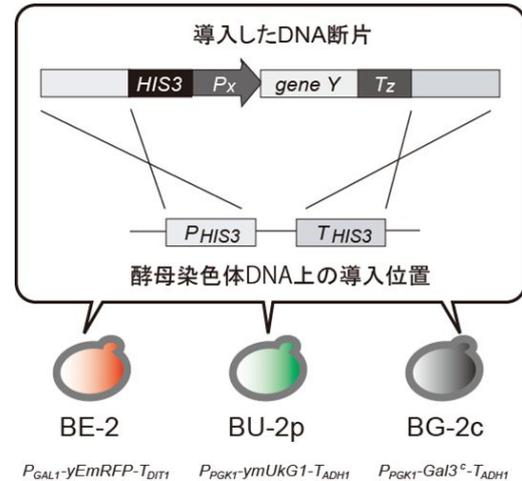


図 2 接合に用いる一倍体酵母の創製

4. 研究成果

まず創製した一倍体酵母に関して、蛍光特性の評価を実施した(図 3)。それぞれ糖成分のみを変更した SD 培地(グルコース: 図 3 シアン)、SR 培地(ラフィノース: 図 3 イエロー)、SGR 培地(ガラクトースおよびラフィノース: 図 3 マゼンタ)を用いて各酵母を培養した結果、使用したプロモーター配列の特性に応じた蛍光発現が観察された。BG-2c 株は、恒常的に GAL1 プロモーター (P_{GAL1}) を活性化する Gal3^c を発現する酵母であるが、蛍光タンパク質の遺伝子を保有しないため、

いずれの培地を用いて培養しても蛍光が観察されなかった。

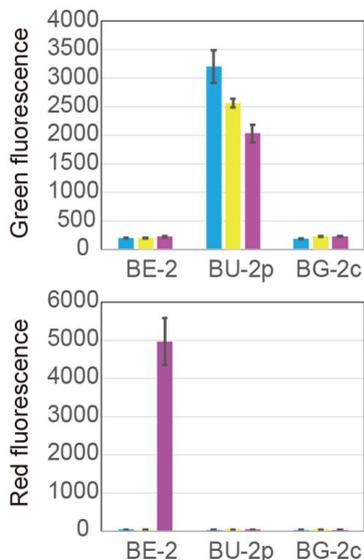


図3 一倍体酵母の蛍光発現特性

つづいて、HO 遺伝子発現ベクターを用いて、図1に示す手順により、BE-2株とBU-2p株を接合させ、二倍体酵母BEU-3L株を創製した。さらにBEU-3L株とBG-2c株を接合させることで、三倍体酵母BEUG-4Lを創製した。得られた二倍体および三倍体酵母と、接合に用いた一倍体酵母の蛍光発現特性を、緑色蛍光強度(Y軸)と赤色蛍光強度(X軸)で構成される2次元プロットにより表現することで、遺伝子パーツの統合に関する可否の判定を実施した(図4)。

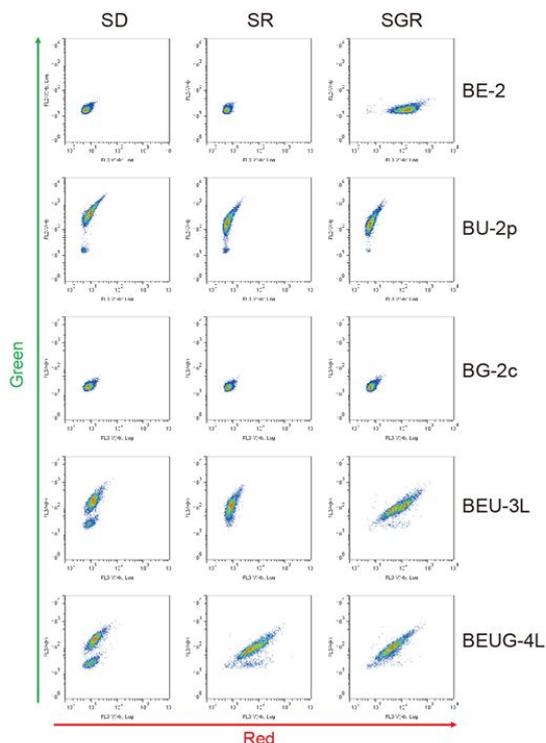


図4 蛍光発現特性の確認

BEU-3L株では、統合した遺伝子パーツが独立して機能するため、SGR培地(ガラクトース)中で赤色蛍光を発現する特性(BE-2株由来)と、全ての培地中で緑色蛍光を発現する特性(BU-2p株由来)を併有していた。またBEUG-4L株は、全ての培地中で P_{GAL1} を活性化する $Gal3^c$ を発現する特性(BG-2c株由来)が追加されたことで、ガラクトースを含まないSR培地(ラフィノース)中でも赤色蛍光を発現することが可能となった。一方、同じくガラクトースを含まないSD培地(グルコース)中では赤色蛍光を発現しないことが確認された。これは培地中に存在するグルコースによって、 P_{GAL1} に対する不活性化が強く働いた結果であると考えられる。SD培地で培養した場合においても、酵母細胞内で $Gal3^c$ が発現していることは、多コピー型プラスミドを用いた検証実験により確認している(図5)。

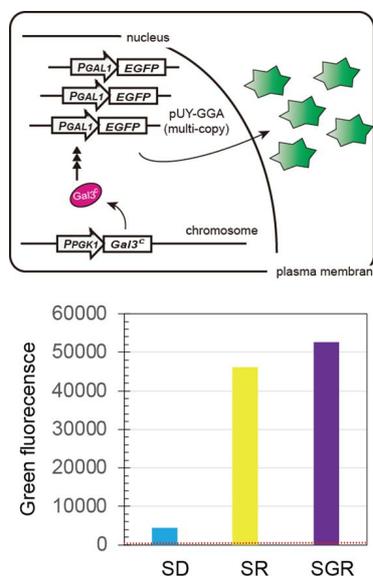


図5 $Gal3^c$ による多コピー型 P_{GAL1} の活性化

図5において赤色破線は、酵母細胞の自家蛍光の水準を示しており、多コピー型遺伝子(緑色蛍光)を用いて増幅することで、SD培地においても検出可能な緑色蛍光の発現が確認された。すなわちSD培地で培養したBEUG-4L株においても、同様に $Gal3^c$ が発現しているが、培地から供給されるグルコースとの量的関係において、赤色蛍光の発現が抑制されていると示唆される。したがって $Gal3^c$ の発現量を著しく向上した場合には、同培地においても赤色蛍光が発現すると予想される。

以上のように、本研究では接合型変換および多段階の接合から構成される多倍体酵母の創製手法を確立することに成功した。本技術は学術研究に利用される一般的な実験室酵母に広く適用することが可能であるため、遺伝子バンク等に存在する豊富なりソースを大いに活用することができる。また酵母細

胞をベクターとした遺伝子パーツの統合は、上述のように各段階で表現型を確認して進めることが可能であるため、望みの表現型を有する多倍体酵母の創製が容易となり、酵母細胞を用いた合成生物学研究の発展に貢献できると期待する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

(1) Fukuda N, Kaishima M, Ishii J, Honda S. "Positive Detection of GPCR Antagonists Using a System for Inverted Expression of a Fluorescent Reporter Gene", ACS Synth Biol, 2017, Vol.6, 1554-1562.
doi: 10.1021/acssynbio.7b00056

(2) Kaishima M, Ishii J, Matsuno T, Fukuda N, Kondo A. "Expression of varied GFPs in *Saccharomyces cerevisiae*: codon optimization yields stronger than expected expression and fluorescence intensity", Sci Rep, 2016, Vol.6, 35932.
doi: 10.1038/srep35932.

(3) Fukuda N, Kaishima M, Ishii J, Kondo A, Honda S. "Continuous crossbreeding of sake yeasts using growth selection systems for a-type and α -type cells", AMB Express, 2016, Vol.6, 45.
doi: 10.1186/s13568-016-0216-x.

[学会発表](計 3件)

(1) 福田 展雄、石井 純、本田 真也「GPCR拮抗薬のポジティブ検出を可能とする反転型レポーター発現系」第69回日本生物工学会大会,2017年9月13日、早稲田大学(東京都・新宿区)

(2) 福田 展雄、本田 真也、「Selection systems for a-type and α -type yeasts using cell-type-specific transcriptional regulation machinery」2nd International Conference on Systems and Synthetic Biology,2016年8月19日、Crowne Plaza Heathrow(London, UK)

(3) 福田 展雄、石井 純、近藤 昭彦、本田 真也「孢子形成過程を回避した酵母の人為的有性生殖法」第68回日本生物工学会大会,2016年9月29日、富山国際会議場(富山県・富山市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
ホームページ等:該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 展雄 (FUKUDA NOBUO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・
バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号:00613548

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし